นิพนธ์ต้นฉบับ

ยีสต์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล

นฤมล โตอ่อน[1] วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล[2] และ เยาวลักษณ์ ดิสระ[3]

Abstract

To-on, N., Charernjiratrakul, W. and Dissara, Y.
Thermotolerant yeasts and application for ethanol production
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(4) : 971-980

A total of 70 thermotolerant yeast strains were isolated at 40°C from 145 samples including fruit, leaves, flowers, soils and oil-palm fruits. Six isolates showed maximum growth at 40°C within 18 h. Three isolates (MIY1, MIY48 and MIY57) were selected based on their ability to ferment glucose and sucrose rapidly (24 h) and showed the maximum temperature for growth at 42°C but it was good at 40°C. MIY57 produced 4.6% (v/v) ethanol at 40°C from a medium containing 15% glucose. The optimum cultivation conditions for growth and ethanol production of MIY57 was 5% inoculum into the fermentation medium containing 15% glucose and 1% yeast extract with initial pH of 4.5 on a shaking incubator at 150 rpm at 40°C. MIY57, under these conditions, produced maximum ethanol of 5.0% (v/v) after 48 h incubation while *S. cerevisiae* TISTR 5048 produced only 3.7% (v/v). Maximum cell dry weight was 7.2 g/L (at 18 h), again much higher than that of *S. cerevisiae* TISTR 5048 (4.1 g/L). Based on morphological, physiological and molecular studies, this strain (MIY57) was identified as *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words : Thermotolerant yeast, ethanol production, yeast extract

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]วท.ม. (จุลชีววิทยา) [2]วท.ม. (จุลชีววิทยา) รองศาสตราจารย์ [3]Ph.D. (Biotechnology) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : yaowaluk.d@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 2 มิถุนายน 2549 รับลงพิมพ์ 11 กุมภาพันธ์ 2550

บทคัดย่อ

นฤมล โตอ่อน วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ เยาวลักษณ์ ดิสระ

ยีสต์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(4) : 971-980

จากการแยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้ ดอกไม้ ใบไม้ ดิน และผลปาล์ม จำนวน 145 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 40°C สามารถแยกยีสต์ทนร้อนได้ 70 ไอโซเลท ในจำนวนนี้ 6 ไอโซเลท เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C ในเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครส พบยีสต์ 3 ไอโซเลท (MIY1 MIY48 และ MIY57) หมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเป็นเอทานอลได้รวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C เมื่อคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C จากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% ไอโซเลท MIY57 ผลิตเอทานอลได้ 4.6% (v/v) นำยีสต์ MIY57 มาเลี้ยงเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล พบว่ายีสต์ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด (5.0% (v/v)) เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5% ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% yeast extract 1% pHเริ่มต้น 4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ (3.7% (v/v)) และได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 7.2 กรัม/ลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง ในขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ได้ 4.1 กรัม/ลิตร เมื่อจัดจำแนกยีสต์ MIY57 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางอณูชีววิทยาบ่งชี้ว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae*

เอทิลแอลกอฮอล์เรียกอีกชื่อว่า เอทานอล เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นผลผลิตจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์พวกยีสต์ จากสับสเตรทที่เป็นสารประกอบพวกแป้งหรือน้ำตาล โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอน-ไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และเอทานอล 2 โมเลกุล ภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Phaff *et al.*, 1968)

ในภาวะที่ทั่วโลกประสบกับปัญหาราคาน้ำมันมีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทยหันมาใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมในน้ำมันเชื้อเพลิง เช่น แก๊สโซฮอล์ เอทานอลสามารถผลิตได้จากปิโตรเลียม หรือการหมักโดยใช้ยีสต์ การทำงานของยีสต์ในการหมักเอทานอลจะมีความร้อนร่วมด้วย แต่ในการหมักเอทานอลโดยทั่วไปมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-35°C (Banat *et al.*, 1992) ดังนั้นการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจึงต้องควบคุมอุณหภูมิในการหมักให้อยู่ในช่วง 30-35°C โดยใช้ระบบหล่อเย็น (cooling system)

ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนได้รับความสนใจศึกษาเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล Abdel-Fattah และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่แยกได้จากดินบริเวณโรงกลั่นสุราและกากน้ำตาล พบยีสต์ 3 จีนัส ได้แก่ *Saccharomyces, Kluyveromyces* และ *Candida* เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 40-43°C แต่มีสองสายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* F111 และ *K. marxianus* WR12 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50°C และผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 43°C ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์เดิม (*S. cerevisiae* SIIC) ที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม จึงนำยีสต์ดังกล่าวไปใช้ในการผลิตเอทานอลโดยไม่ใช้ระบบหล่อเย็น ทั้งยังใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง

นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นที่ศึกษาการผลิตเอทานอลในห้องปฏิบัติการโดยใช้ยีสต์ทนร้อน (D'Amore *et al.*, 1989; Banat *et al.*, 1992; Kiran Sree *et al.*, 2000) ดังนั้นการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเจริญและหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนมีอัตราการหมักเร็วจึงช่วยลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอล (Abdel-Fattah *et al.*, 2000) นอกจากนี้การที่ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าและไม่ต้องใช้ระบบหล่อเย็น ทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง 30-35% (Singh *et al.*, 1998; Abdel-Fattah *et al.*, 2000) การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนเพื่อนำมาผลิตเอทานอลจึงเป็นงานที่น่าสนใจ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและนำมาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต

เอทานอลในห้องปฏิบัติการ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นพื้นฐานเพื่อศึกษาในระดับโรงงานนำร่องและต่อเนื่องไปยังระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การแยกและการคัดเชื้อยีสต์ทนร้อน

การแยกยีสต์ทนร้อน จากตัวอย่าง ผลไม้ ใบไม้และดอกไม้ ตามวิธีของ Campbell and Duffus (1988) โดยผลไม้ใช้วิธีการ streak โดยตรงบนอาหารแข็ง yeast malt medium (YM) ประกอบด้วย yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1% และ agar 2% ส่วนตัวอย่างใบไม้ และดอกไม้ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM เพื่อเพิ่มจำนวนยีสต์ จากนั้น streak ลงบนอาหารแข็ง YM อาหารทั้งหมดที่ใช้แยกเชื้อมี pH 5.5 และเติม penicillin (60 μg/ml) และ streptomycin (100 μg/ml) ตัวอย่างดินและผลปาล์มแยกตามวิธีของ ขนิษฐา (2543) บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันและทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธีการ restreak ลงบนอาหาร YM บ่มที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 ชั่วโมง และเก็บ stock เชื้อในอาหาร YM slant ที่อุณหภูมิ 4°C

คัดเลือกยีสต์ที่แยกได้ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 40°C วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง ยีสต์ที่มีการเจริญดี (OD_{660} nm มากกว่า 1) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครส ตามวิธีของ Barnatt และคณะ (2000) ที่อุณหภูมิ 40°C คัดเลือกยีสต์ที่หมักได้รวดเร็วมาศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ 44°C วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง นาน 48 ชั่วโมง นำยีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°C มาทดสอบการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C โดยถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10% ลงในอาหาร yeast fermentation medium (YFM) ประกอบด้วย yeast extract 0.6%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.4%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.1% และ glucose 15% (Banat *et al.*, 1992) บ่มที่อุณหภูมิ 40°C วัดการผลิตเอทานอลและน้ำตาลที่เหลือ ที่เวลา 72 ชั่วโมง การทดลองใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5048 เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ยกเว้นขั้นตอนการคัดเลือกใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus*

2. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์

2.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และกากน้ำตาล

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10% ลงในอาหาร YFM ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มี pH เริ่มต้น 5.5 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 15 และ 20% สำหรับกากน้ำตาลปรับให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ 10 15 และ 20% เช่นกัน ด้วยวิธี Phenol Sulfuric (Dobois *et al.*, 1956) เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40°C การทดลองทำ 2 ซ้ำ

2.2 ปริมาณของ yeast extract

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10% ลงในอาหาร YFM ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล.ที่มีแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.1 และมีปริมาณ yeast extract 3 ระดับ ได้แก่ 0.3 0.6 และ 1.0% pH เริ่มต้น 5.5 นำมาเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40°C การทดลองทำ 2 ซ้ำ

2.3 pH เริ่มต้นของอาหาร

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10% ลงในอาหาร YFM ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.1 ปริมาณ yeast extract ตามข้อ 2.2 ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40°C การทดลองทำ 2 ซ้ำ

2.4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5 และ 10% โดยถ่ายเชื้อเริ่มต้นลงในอาหาร YFM ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.1 ปริมาณ yeast extract ตามข้อ 2.2 และ pH เริ่มต้นของอาหารตามข้อ 2.3 เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40°C การทดลองทำ 2 ซ้ำ

3. การเจริญและการผลิตเอทานอลจากสภาวะที่เหมาะสม

จากปัจจัยที่ได้ในการทดลองข้อ 2.1-2.4 นำมาใช้

ศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหาร YFM ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40°C การทดลองทำ 2 ซ้ำ

4. วิธีวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล

การวัดการเจริญทำโดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้กราฟมาตราฐานระหว่างค่าความขุ่นกับน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยตรง (สาโรจน์ และคณะ, 2544) น้ำหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer และวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitro-salicylic Acid Method (DNS) (Miller, 1959)

5. การจัดจำแนกยีสต์

การจัดจำแนกยีสต์ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาตามวิธีของ Kurtzman และคณะ (1998) โดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5048 เป็นตัวเปรียบเทียบ และส่งตัวอย่างตรวจที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งใช้ชุดทดสอบ API 20C AUX (BioMerieux/France) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ลักษณะทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี DNA sequencing electropherogram โดยการส่งตัวอย่างตรวจที่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการสกัด DNA นำไปเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วน 26S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ตรวจหาลำดับเบสที่ 26S rRNA gene จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน The National Center for Bio-technology Information website (NCBI website)

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การแยกและคัดยีสต์ทนร้อน

จากตัวอย่างผลไม้ ดอกไม้ ใบไม้ ดิน และผลปาล์ม จำนวน 145 ตัวอย่าง แยกยีสต์ทนร้อนได้ 70 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 40°C (Table 1) เมื่อนำยีสต์ทั้งหมดมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 40°C พบยีสต์ 6 ไอโซเลท ได้แก่ MIY1 ที่แยกได้จากกล้วย MIY14 แยกได้จากมะละกอ MIY3 และ MIY27 จากน้ำตาลโตนด และ MIY48 และ MIY57 แยกได้จากผลปาล์ม ที่เจริญได้ดีในเวลา 18 ชั่วโมง มีค่า OD_{660} nm มากกว่า 1 ในจำนวนนี้ 3 ไอโซเลท (MIY1 MIY48 และ MIY57) หมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสเป็นเอทานอลได้รวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40°C และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C โดย MIY48 เจริญดีกว่า MIY1 และ MIY57 (Figure 1) เมื่อคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C จากอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% พบว่า MIY57 ผลิตเอทานอลได้ 4.6%(v/v) สูงกว่าสายพันธุ์อื่นและสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุด (2.1% (w/v) (Figure 2) ความสามารถในการเจริญและการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ การคัดแยกยีสต์ทนร้อนมักใช้อุณหภูมิ 40°C หรือสูงกว่า 40°C ซึ่งยีสต์ทนร้อนที่มีรายงานส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Saccharomyces* และ *Kluyveromyces* (D'Amore *et al.*, 1989; Banat *et al.*, 1992; Kiran Sree *et al.*, 2000; Abdel-Fattah *et al.*, 2000) จากผลการทดลองจึงเลือกเชื้อยีสต์ MIY57 ไปศึกษาต่อโดยใช้ *S. cerevisia* TISTR 5048 เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอทานอล

ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 15 และ 20% ยีสต์ MIY57 มีการเจริญและการผลิตเอทานอลเร็วกว่า *S.*

Table 1. Isolates of thermotolerant yeasts

Samples	Number of samples	Number of isolates
1. Fruits		
- Banana	9	1
- Papaya	14	6
- Pine apple	21	7
- Orange	5	1
- Grapes	13	9
2. Leaves and flowers	16	-
3. Palm juice	31	13
4. Soils	17	8
5. Oil-palm fruits	19	25
Total	145	70

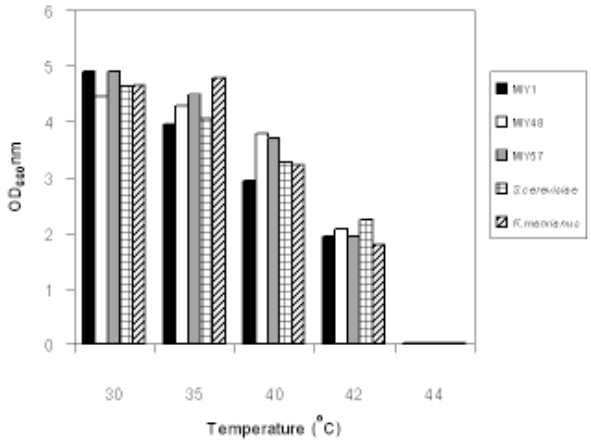

Figure 1. Growth of thermotolerant yeasts MIY1, MIY48 and MIY57 and for comparison strains of *S. cerevisiae* TISTR 5048 and *K. marxainus* at 30, 35, 40, 42 and 44°C with yeast malt medium broth (pH 5.5) for 48 h.

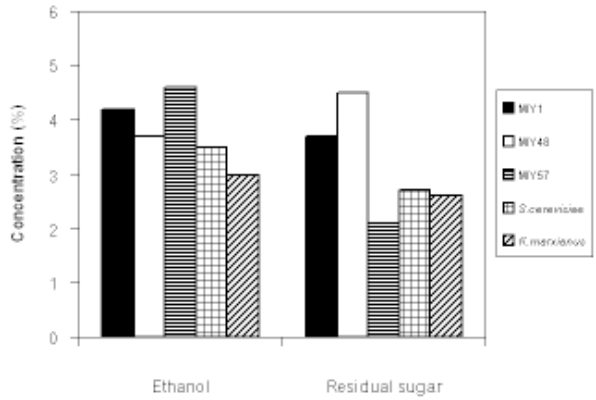

Figure 2. Ethanol production and residual sugar of thermotolerant yeasts MIY1, MIY48 and MIY57 and for comparison strains of *S. cerevisiae* TISTR 5048 and *K. marxainus* growing for 72 h from a 10% inoculum with yeast fermentation medium containing 15% glucose at pH 5.5, on a incubator shaking at 150 rpm and 40°C

cerevisiae TISTR 5048 (Figure 3a และ Table 2) โดย MIY57 เจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.3 5.5 และ 5.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในเวลา 12 ชั่วโมง

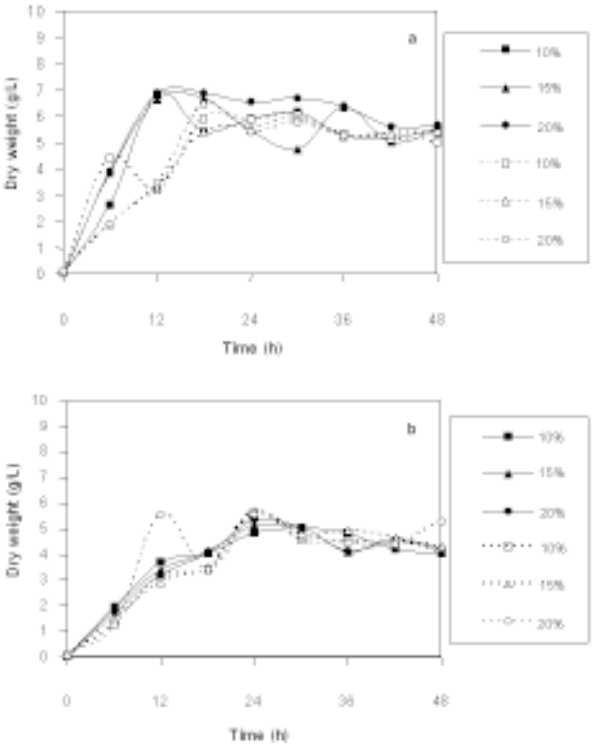

Figure 3. Growth of the thermotolerant yeast MIY57 (solid lines) and *S. cerevisiae* TISTR 5048 (dashed lines) with yeast fermentation medium containing glucose(a) and molasses(b) at concentrations of 10, 15 and 20 %(w/v) and yeast extract 0.6 %(w/v) at pH 5.5, starting with a 10% inoculum on a shaking incubator at 40°C and 150 rpm for 48 h.

หลังจากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) และผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.3% (v/v) จากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15% ส่วนการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ยีสต์ MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 มีการเจริญใกล้เคียงกันทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (Figure 3b) แต่เจริญน้อยกว่าในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3 ถึง 3.7 กรัม/ลิตร MIY57 ผลิตเอทานอลได้ 4.0% (v/v) ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมด 20% แต่มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (8.2 % (w/v)) ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นอื่น MIY57 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญและการผลิต

Table 2. Ethanol production and residual sugar of the thermotolerant yeast MIY57 and for comparison strain of *S. cerevisiae* TISTR 5048 with yeast fermentation medium containing glucose and molasses at 10, 15 and 20%(w/v), yeast extract 0.6%(w/v), pH 5.5 and starting with a 10% inoculum on a shaking incubator at 40°C and 150 rpm for 48 h. at 40°C and 150 rpm for 48 hr.

Carbon sources		Strains			
		MIY57		*S. cerevisiae* TISTR 5048	
		Ethanol %(v/v)	Residual sugar %(w/v)	Ethanol %(v/v)	Residual sugar %(w/v)
Glucose (w/v)	10%	4.0	1.7	2.7	1.8
	15%	4.3	3.5	3.0	3.4
	20%	3.9	4.9	4.2	4.8
Molasses (w/v)	10%	3.7	4.2	2.7	4.1
	15%	2.8	6.5	3.0	8.9
	20%	4.0	8.2	4.2	7.9

เอทานอลได้ดีกว่าอาหารที่เติมกากน้ำตาลอาจเนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อีกทั้งกากน้ำตาลมีองค์ประกอบที่ซับซ้อน มีทั้งน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ (เช่น กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส) และนำไปใช้ไม่ได้ มีแร่ธาตุต่างๆ เช่น ไนโตรเจน และฟอสเฟต ในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ (สาวิตรี, 2540; Panchal and Tavares; 1990) การผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ MIY57 เมื่อเทียบกับบางรายงานอาจต่ำกว่า เช่น *K. marxianus* var. marxianus (Anderson *et al.*, 1986) *S. diasticus* No. 62 (D'Amore *et al.*, 1989) *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 (Kiransree *et al.*, 2000) และ *K. marxianus* IMB1-IMB5 (Banat *et al.*, 1992) แต่เมื่อพิจารณาปัจจัยอื่นๆ พบว่า MIY57 ยังคงมีชีวิตรอดหลังจาก 48 ชั่วโมง และการหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากธรรมชาติยังไม่ได้รับการชักนำหรือเปลี่ยนแปลงจึงมีความน่าสนใจ จากผลการทดลองนี้พบว่า MIY57 ผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกันทุกความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ แต่ผลิตเอทานอลสูงสุดในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% ดังนั้นเมื่อพิจารณาในเรื่องต้นทุนของการผลิต จึงเลือกใช้น้ำตาลกลูโคส 15% ในการศึกษาต่อไป

ผลของปริมาณ yeast extract ต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ MIY57 แสดงดัง Figure 4a และ 4b พบว่า MIY57 มีการเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ โดยมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และที่เวลา 18 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.4 6.9 และ 6.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ ที่ปริมาณ yeast extract 1.0% ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 5.6% (v/v) และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 2.0% (w/v) ปริมาณ yeast extract มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการสร้างโปรตีนของเซลล์ yeast extract จึงเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจนและวิตามินที่สำคัญช่วยในการเจริญ การแบ่งเซลล์ และฟื้นฟูความสามารถในการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ (สืบศักดิ์ และคณะ, 2547; Dombek and Ingram, 1986) อีกทั้ง yeast extract ช่วยส่งเสริมให้ยีสต์มีการใช้น้ำตาลได้ดีขึ้น (D'Amore *et al.*, 1989) จึงเลือกใช้ yeast extract 1.0% เพื่อให้มีปริมาณของไนโตรเจนเพียงพอต่อความต้องการในการเจริญและผลิตเอทานอล

การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ MIY57 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเป็น 4.5 5.5 และ 6.5 พบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่า *S. cerevisiae* TISTR

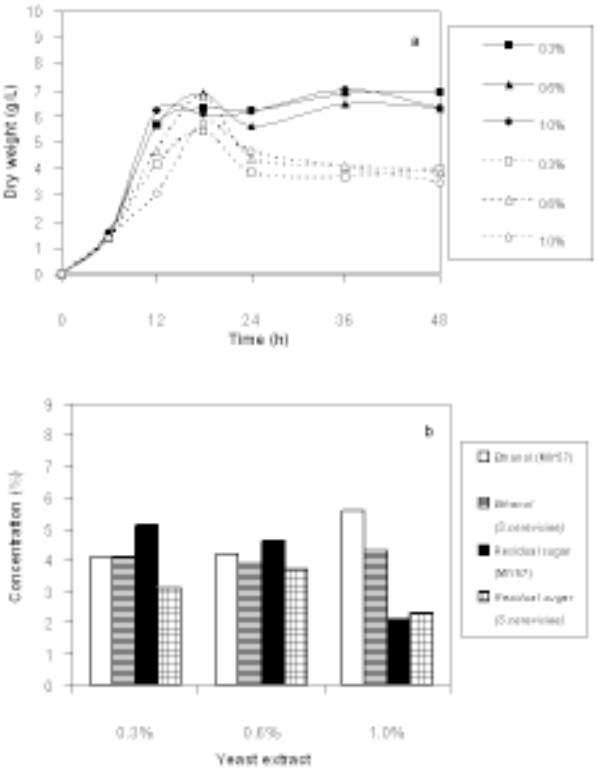

Figure 4. Growth(a) and ethanol production and residual sugar(b) of the thermotolerant yeast MIY57 (solid lines) and *S. cerevisiae* TISTR 5048 (dashed lines) with yeast fermentation medium containing 15 %(w/v) glucose and yeast extract at 0.3, 0.6 and 1.0 %(w/v), pH 5.5, starting with a 10% inoculum on a shaking incubator at 40°C and 150 rpm for 48 h.

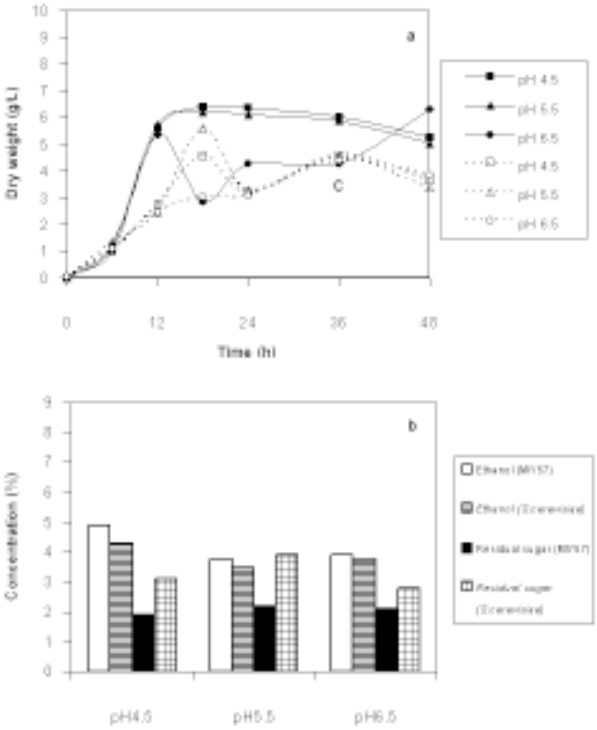

Figure 5. Growth (a) and ethanol production and residual sugar (b) of the thermotolerant yeast MIY57 (solid lines) and *S. cerevisiae* TISTR 5048 (dashed lines) with yeast fermentation medium containing 15%(w/v) glucose, 1.0%(w/v) yeast extract, pH 4.5, 5.5 and 6.5 starting with a 10% inoculum on a shaking incubator at 40°C and 150 rpm for 48 h.

5048 ที่ใช้เปรียบเทียบภายใน 12 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.0 5.8 และ 5.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และผลิตเอทานอลดีที่สุด (4.9%(v/v)) ที่ pH 4.5 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลืออยู่ 1.9 % (w/v) (Figures 5a and 5b) ยีสต์โดยทั่วไปเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด pH ของอาหารจะมีผลต่ออัตราการหมักอีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย (สาวิตรี, 2540; Singh *et al*., 1998) จึงเลือกปรับ pH ของอาหารเป็น 4.5 ในการทดลองเรื่องปริมาณของเชื้อเริ่มต้น

ผลของเชื้อเริ่มต้นที่ 5 และ 10% ต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล (Figure 6a and 6b) พบว่า MIY57 มีการเจริญและผลิตเอทานอลดีกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ โดย MIY57 มีการเจริญอย่างรวดเร็วได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.6 และ 6.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 18 ชั่วโมง เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5% ยีสต์ให้ผลผลิตเอทานอลได้ 4.7% (v/v) สูงกว่าเมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 10% เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีสต์มีการเจริญใกล้เคียงกัน ทำให้มีปริมาณผลผลิตเอทานอลไม่ต่างกันมากนัก อีกทั้งมีน้ำตาลที่เหลือในอาหารอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน (2.4-2.5%(w/v)) สอดคล้องกับรายงานของ D'Amore และคณะ (1989) ที่รายงานว่าการใช้เชื้อเริ่มต้น (*S. diastaticus* NO. 62) ปริมาณ 0.35 ถึง 3.5% ยีสต์มีการเจริญและให้ผลผลิต

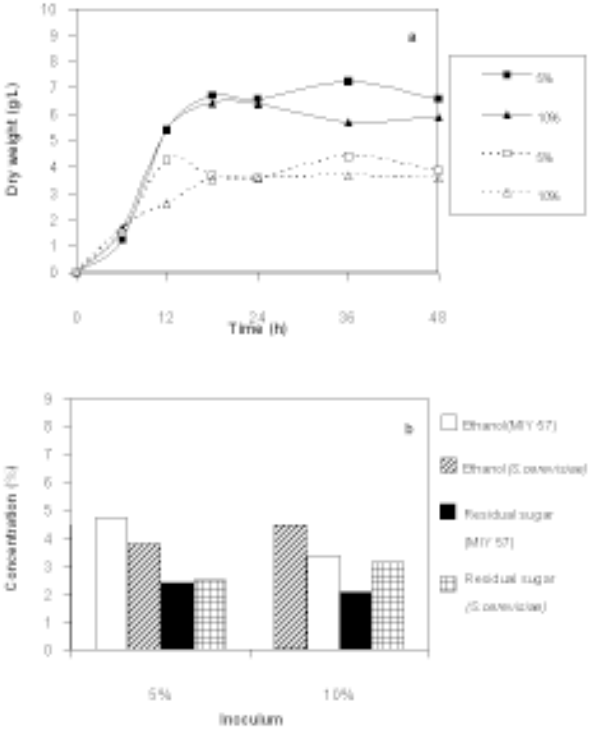

Figure 6. Growth(a) and ethanol production and residual sugar(b) of the thermotolerant yeast MIY57 (solid lines) and *S. cerevisiae* TISTR 5048 (dashed lines) with yeast fermentation medium containing 15%(w/v) glucose, 1.0%(w/v) yeast extract, at pH 4.5, starting from a 5 and 10% inoculum on a shaking incubator at 40°C and 150 rpm for 48 h.

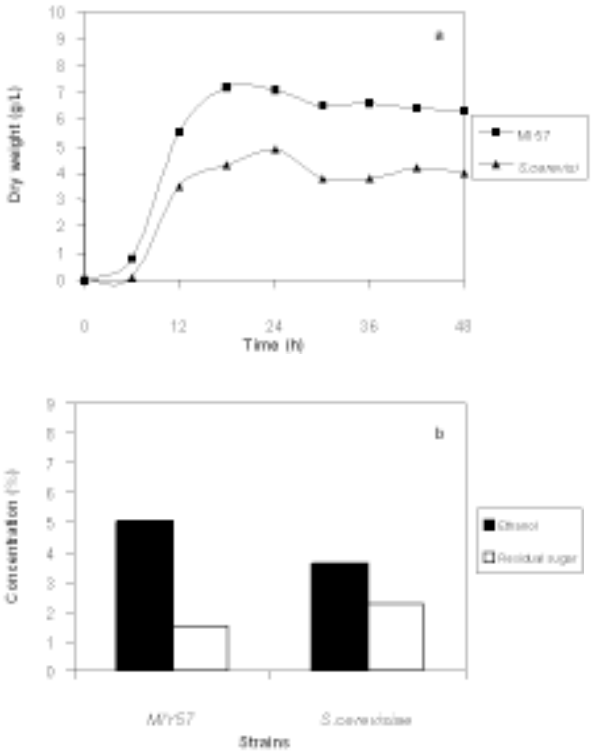

Figure 7. Growth(a) and ethanol production and residual sugar(b) of the thermotolerant yeast MIY57 and *S. cerevisiae* TISTR 5048 with yeast fermentation medium containing 15%(w/v) glucose, 1.0%(w/v) yeast extract, pH 4.5, starting with a 5% inoculum on a shaking incubator at 40°C and 150 rpm for 48 h.

เอทานอลใกล้เคียงกัน เมื่อนำยีสต์ MIY57 มาศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% เลี้ยงในอาหาร YFM pH 4.5 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% yeast extract 1.0% ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 40°C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่า MIY57 มีการเจริญอย่างรวดเร็วได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.2 กรัม/ลิตร ที่ 18 ชั่วโมง สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบที่เจริญได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.1 กรัม/ลิตร (Figures 7a และ 7b) ปริมาณเอทานอลที่ 48 ชั่วโมงสูงถึง 5% (v/v) และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเพียง 1.5% (w/v) น้อยกว่า *S. cerevisia*e TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ

ถึงแม้ว่ายีสต์ MIY57 จะผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบแต่เมื่อเทียบกับรายงานที่ผ่านมา (D'Amore *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1986; Banat *et al.*, 1992; Kiran Sree *et al.*, 2000; Abdel-Fattah *et al.*, 2000) พบว่า ยีสต์ดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ MIY57 ซึ่งคุณสมบัติในการทนร้อนของยีสต์เป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ การเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิสูงมีผลทำให้คุณสมบัติต่างๆ ทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาเปลี่ยนแปลง (Walker, 1998) ทั้งยังมีผลยับยั้งกระบวนการหายใจและการหมักเอทานอล

ของยีสต์ (สาวิตรี, 2540)

การจัดจำแนกยีสต์

เมื่อนำยีสต์ MIY57 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ พบว่า มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีครีมด้าน เซลล์มีความกว้าง 3-7 ไมโครเมตร และยาว 5-10 ไมโครเมตร สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบ multipolar budding และมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore รูปร่างกลม จำนวน 1-4 ascospore ต่อ ascus สามารถหมักน้ำตาล (sugar fermentation) D-glucose, sucrose และ D-maltose ได้ ใช้น้ำตาล (sugar assimilation) D-glucose, sucrose, raffinose และ D-maltose ได้ แต่ไม่ใช้ lactose, D-galactose, D-melibiose, D-cellobiose, D-trehalose, D-xylose, inositol และ dulcitol เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่ใช้โซเดียมไนไตรท์ และโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่ทำปฏิกิริยากับสี diazonium Blue B ไม่ผลิตเอนไซม์ Urease เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ไม่ผลิตเอนไซม์ Phenoloxidase และไม่เจริญในอาหาร Color CHROMagar เมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20C AUX (BioMerieux/France) พบว่า ยีสต์ MIY57 ใช้ D-glucose, D-maltose D-saccharose และ D-raffinose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่แหล่งคาร์บอนที่ไม่ใช้ ได้แก่ L-arabinose, D-galactose, D-lactose, D-cellobiose, D-melezitose, D-trehalose, D-xylose, glycerol, calcium 2 ceto gluconate, adonitol, xylitol, inositol, D-sorbitol, methyl D-glucopyranoside และ N-acetyl-glucosamine จากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่า MIY57 เป็น *S. cerevisiae* และจากผลการหาลำดับเบสบน 26S rRNA gene ส่วน D1/D2 domain เมื่อนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูลใน NCBI website โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) พบว่ายีสต์ MIY57 มีความเหมือน (similarity) กับเชื้อ *S. cerevisiae* อยู่ถึง 97% จึงบ่งชี้ว่าเป็น *S. cerevisiae*

สรุปผลการทดลอง

ยีสต์ MIY57 แยกได้จากผลปาล์มเป็นยีสต์ทนร้อน เจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร YFM ที่ประกอบด้วยกลูโคส 15% ปริมาณ yeast extract 1% pH เริ่มต้นของอาหาร 4.5 โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 5% MIY57 เจริญได้สูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.2 กรัม/ลิตร และผลิตเอทานอลได้ 5.0% (v/v) ที่เวลา 48 ชั่วโมง สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ และเมื่อนำไปจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางอณูชีววิทยา พบว่าเป็น *Saccaharomyces cerevisiae*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทบวงมหาวิทยาลัย ขอขอบคุณ Dr Brian Hodgson ที่ปรึกษาด้านภาษาอังกฤษ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขต้นฉบับ และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กองบรรณาธิการฯ เรียนเชิญให้ตรวจสอบและแก้ไขงานชิ้นนี้ให้สมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์. 2543. การผลิตเซลล์ยีสต์จากน้ำมันปาล์มดิบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล วรสิทธิ์ โทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

สืบศักดิ์ กลิ่นสอน จุฑารัตน์ ทิมบัว และ รสจรินทร์ ปราบปรี. 2547. ผลของปัจจัยการเตรียมส่าเชื้อยีสต์จากกากน้ำตาลที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์และประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ ในรายงานการประชุมเสนอผลงานวิจัย การประชุมวิชาการเพื่อการนำเสนอผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abdel-Fattah, W.R., Fadil, M., Nigam, P. and Banat, I.M. 2000. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery, Biotechnol. Bioeng., 68 : 531-535.

Anderson, P.J., McNeil, K. and Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. marxianus isolated from sugar mills, Appl. Environ. Microbiol., 51 : 1314-1320.

Banat, I.M., Nigam, P. and Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C, World J. Microbiol. Biotechnol., 8 : 259-263.

Barnett, I.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. 2000. Yeasts Characteristics and Identification, Cambridge University Press, Cambridge.

Campbell, I. and Duffus, J.H. 1988. Yeast a practical approach, IRL Press, Oxford.

D'Amore, T., Celotto, G., Russell, I. and Stewart, G.G. 1989. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C, Enzyme. Microb. Technol., 11 : 411-416.

Dobois, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substraces, Anal. Chem., 28 : 350-356.

Dombek, K.M. and Ingram, L.O. 1986. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation, Appl. Environ. Microbiol., 52 : 975-981.

Kiran Sree, N, Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M. and Venkateswar Rho, L. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production, Bioresour. Technol., 72 : 43-46.

Kiransree, N, Sridhar, M. and Venkateswar Rho, L. 2000. Characterisation of thermotolerant, ethanol tolerant fermentative *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production, Bioprocess Eng., 22 : 243-246.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. The Yeasts, a Taxonomic Study 4th ed, Elsevier Science Publ., Amsterdam.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem., 31 : 426-428.

Panchal, C.J. and Tavares, F.C.A. 1990. Yeast strain selection for fuel ethanol production. **In** Yeast strain selection, Panchal, C.J.(Editor) Marcel Dekker, Inc. New York.

Phaff, H.J., Miller, M.W. and Mrak, E.M. 1968. The Life of Yeasts, Harvard University Press, Massachusetts.

Singh, D., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R. and McHale, A.P. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentration : Part II- use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3, World J. Microbiol. Biotechnol., 14 : 823-834.

Walker, G.M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.